



展 TENBO 望

ヒト水晶体上皮細胞に放射線を照射すると何が起きるのか



浜田 信行
Hamada Nobuyuki



藤通 有希
Fujimichi Yuki

(電力中央研究所 原子力技術研究所
放射線安全研究センター)

1 はじめに

本来透明な眼の水晶体が電離放射線に被ばくすると、混濁して白内障になることは1897年から知られていたが、放射線防護の関心事となったのは、原爆被爆者と加速器作業者における白内障が報告され始めた1940年代後半のことである。これを受けて、国際放射線防護委員会(ICRP)は、1950年に白内障を放射線影響に初めて含め、1969年から放射線白内障はしきい値型の放射線応答を示すとして、1977年から非確率的影響(その後は確定的影響と呼ばれ、現在は組織反応と呼ばれている)に分類してきた¹⁾。

2011年にICRPは、1%のヒトに視覚障害性白内障が生じるしきい線量を、従来の>8 Gyから0.5 Gyへと大幅に引き下げた²⁾。このようなしきい値は、疫学的知見のみに基づき、様々な仮定をおいて決められており、生物学的な裏付けはない^{3,4)}。近年の疫学研究はしきい値が

ないことを示していることから確率的影響である可能性も出始めており⁵⁾、発症機構の解明が必須である。

そこで、水晶体の中で唯一増殖能を持ち、放射線の影響を受けやすいと考えられる細胞集団である水晶体上皮細胞⁶⁾の放射線応答を調べることにした。

2 水晶体上皮細胞の放射線致死感受性は高いか

放射線の生物影響を考える上で、細胞の放射線致死感受性は最も重要な因子の1つである。その評価には、コロニー形成法*が最も頻用されている。ICRPは、2007年勧告において、生体内で最も放射線高感受性な組織は、生殖腺、

* コロニー形成法：播種した1個の細胞が50個以上の細胞集団(生存コロニー)に増殖可能な細胞の割合を指標として生存率を求める手法。

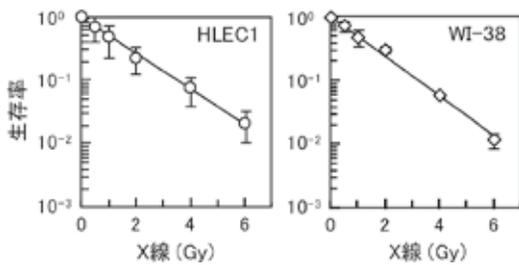


図1 コロニー形成法により評価した生存率

骨髓、水晶体であるとしている⁷⁾が、水晶体の細胞を用いたコロニー形成法の報告はない。そこで、ヒト初代水晶体上皮細胞である HLEC1 に X 線を照射後、コロニー形成実験を実施した。比較対照として、ヒト初代肺線維芽細胞である WI-38 を用いた。その結果、HLEC1 と WI-38 の生存率に有意な差はなく、放射線感受性は同程度、つまり、同じ線量であれば、両細胞で同じ割合の細胞が生存コロニーを形成可能であることが分かった (図 1^{8,9)})。

3 水晶体上皮細胞には、放射線によって不活性化される細胞と増殖が促進される細胞が存在する

放射線を照射した細胞に由来するコロニーの大きさとその構成細胞数は、高線量ほど減少するということは、放射線生物学における一般常識である⁹⁻¹³⁾。それを確かめるために、コロニー形成法実験で得たコロニーの大きさと構成細胞数を解析した。

非照射細胞の生存コロニーの面積は、HLEC1 と WI-38 に有意差はなかった。照射細胞の生存コロニーの面積は、WI-38 では ≥ 1 Gy で有意に減少したが、逆に、HLEC1 では ≥ 2 Gy で有意に増加した (図 2^{8,9)})。例えば、6 Gy を照射した WI-38 と HLEC1 の生存コロニーの平均面積は、それぞれ 0 Gy の 0.6 倍と 2.4 倍であった (典型的な 10 cm ディッシュの写真を図 3^{8,9)} に示す)。HLEC1 の各生存コロニーの構成細胞数も ≥ 2 Gy で有意に増加し (図 4^{8,9)})、

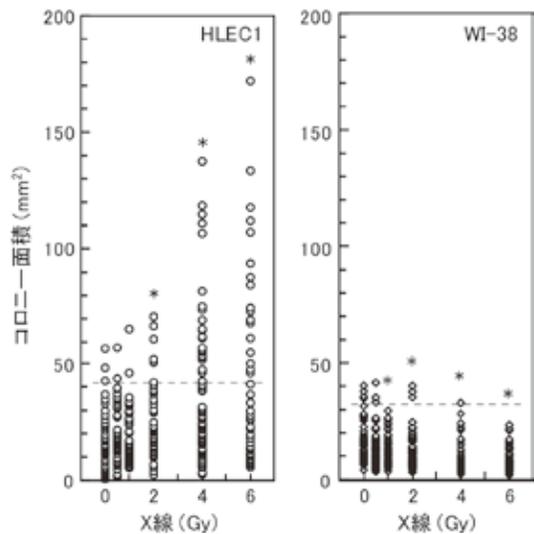


図2 生存コロニーの面積

* $p < 0.05$ 。点線は非照射細胞での平均値にその標準偏差の 2 倍を足した値

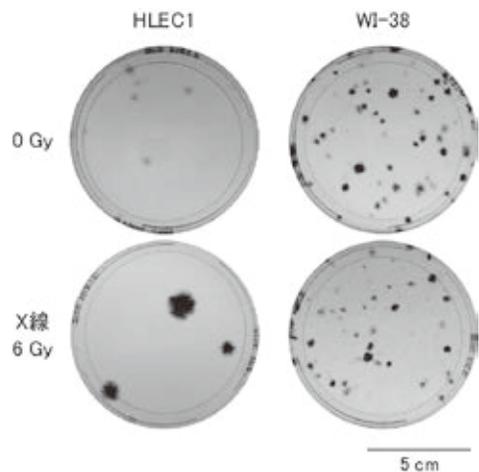


図3 コロニー形成に用いた 10 cm ディッシュ

4 Gy と 6 Gy では巨大コロニー (非照射細胞の生存コロニーの平均面積にその標準偏差の 2 倍の値を加えた面積を上回る生存コロニーと定義) が全生存コロニーの約 3 分の 1 を占めた (図 5^{8,9)})。巨大コロニーの推定構成細胞数は最大で 57,745 個、つまり倍加時間は < 21.0 時間、15.8 回は分裂したこととなり、非照射時の増殖曲線から求まる倍加時間が 66.6 時間であ

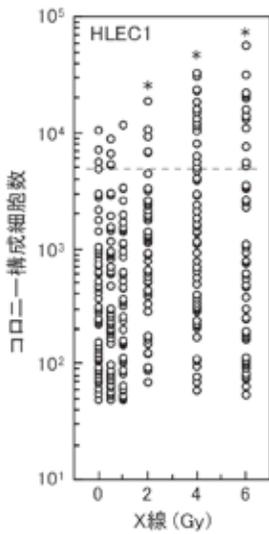


図4 生存コロニーの構成細胞数
* $p < 0.05$ 。点線は非照射細胞での平均値にその標準偏差の2倍を足した値

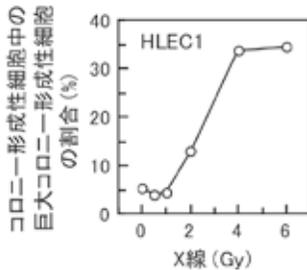


図5 コロニー形成性細胞中の巨大コロニー形成性細胞の割合

ることと比べると、著しく早い^{8,9)}。全播種細胞中の巨大コロニー形成性細胞の割合は、0.5～4 Gyの範囲で線量によらずほぼ一定(約2,600分の1)であった(図6^{8,9)})。このような巨大コロニー形成性細胞は、高線量を照射されても不活化から免れることができる放射線抵抗性細胞のはずである。

興味深いことに、ヒト初代包皮線維芽細胞であるAG01522Dの場合、50個未満の細胞から構成される増殖不全コロニーの割合は線量の増加に伴い増加したが、それとは逆に、HLEC1では、例えば、4 Gyと6 Gyでは、構成細胞数

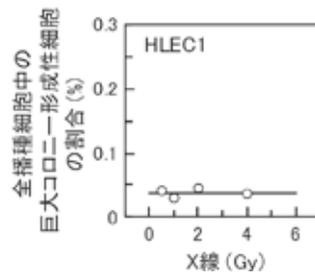


図6 全播種細胞中の巨大コロニー形成性細胞の割合

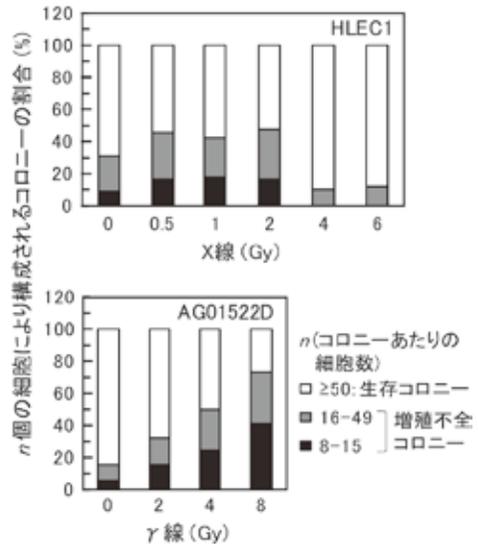


図7 ≥ 8 個の細胞により構成される全コロニーのうち、8～15個、16～49個、 ≥ 50 個の細胞により構成されるコロニーの割合

が16～49個の増殖不全コロニーの割合が著しく減少し、8～15個の増殖不全コロニーは全く認められなかった(図7^{8,9,11)})。このように、HLEC1の増殖不全コロニー形成性細胞は、AG01522Dよりも不活性化されやすく、その機構としては増殖停止が長くなりやすいか死に至りやすいことが考えられる。この可能性は、同じ生存率を与える線量を照射した場合、WI-38よりHLEC1の方が、不可逆的増殖停止である早期細胞老化の頻度が高かったことを示す予備的な検討結果¹⁵⁾から、示唆される。

以上の解析から、放射線をHLEC1に照射す

ると、一部の細胞は不活性化され、ほかの細胞では逆に増殖が促進されることが明らかとなった。

4 増殖するかしないかの二値的ともいえる水晶体上皮細胞のユニークな放射線応答の生物学的意義は何か

放射線白内障は、主として後囊下に生じる。水晶体は、水晶体嚢と呼ばれる被膜で全体が包まれている。水晶体嚢の後ろ半分は後囊と呼ばれ、後囊下とは後囊の内側のことを指す。後囊下白内障には、被ばく後の数か月で生じる早発性のものであれば、数十年掛かる遅発性のももある¹⁵⁾。水晶体は生涯増殖を続けるも、水晶体嚢で包まれているために、全ての細胞が生死によらず水晶体内に留まり続ける閉鎖系である。水晶体が透明な理由の1つは、前面一層の水晶体上皮細胞が、水晶体内部を構成する水晶体線維細胞に終分化する過程で、核やミトコンドリアなど、光の散乱体となる全ての細胞内小器官を失うためである。水晶体上皮細胞を過剰に増殖させると後囊下白内障が生じること¹⁶⁾を踏まえると、放射線によって局所的に過剰に増殖した水晶体上皮細胞が、終分化する前に細胞内小器官を持ったまま後囊側に急激に押しやられることで、早発性後囊下白内障が発症する可能性が考えられる。

放射線照射による水晶体上皮細胞の増殖促進を直接的に示したのは我々が初めてであるが、1955年に von Sallmann が、唯一、X線をウサギ個体に照射した5~>21日後に、ウサギ水晶体上皮における分裂細胞の割合が非照射時よりも増加することを報告しており¹⁷⁾、増殖促進が個体レベルでも起こる可能性を示唆している。重要なことに、HLEC1の増殖促進が有意になったのは ≥ 2 Gy⁸⁾、von Sallmann が観察した分裂像が顕著に増加したのも ≥ 250 r (約 ≥ 2.5 Gyに相当)であり、これらの線量域は、ICRPが2011年まで勧告してきた視覚障害性白内障に

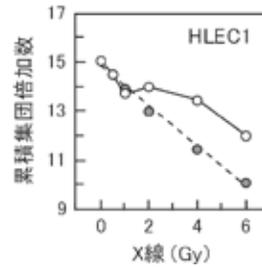


図8 全細胞集団の累積集団倍加数

白丸は実際の累積集団倍加数。灰色の丸は放射線による増殖促進が起こらないと仮定した場合の累積集団倍加数

に対する急性被ばくのしきい線量 (2~10 Sv) と一致する^{1,8)}。その一方、同じ後囊下白内障が存在する場合を比較すると、進行が速い場合の方が水晶体のサイズは小さいことが知られている¹⁸⁾。水晶体のサイズと細胞数は相関関係があると考えられるため、早発性の後囊下白内障を呈する水晶体は全体としては増殖能が低下していると考えられる。このことは、放射線によって誘発される水晶体上皮細胞の増殖促進と一見矛盾して見えるであろう。しかし、HLEC1において、放射線照射後に細胞集団全体の累積倍加数が減少する程度は、巨大コロニーの形成として現れる一部の細胞の増殖促進のため大幅に軽減されたものの、非照射時より減少していた(図8^{8,9)})ことから、細胞集団全体としては増殖能が低下していると考えられる。

遅発性の後囊下白内障は、不活化細胞が、分化することなく後囊側にゆっくりと時間をかけて移行することにより発症すると考えられ、そのため、しきい値がないのかもしれない¹⁵⁾。

5 おわりに

水晶体上皮細胞の放射線致死感受性の評価に初めて成功した。HLEC1の照射後の増殖促進と不活化という二値的ともいえる放射線応答は、新たな生物学的現象として興味深い上に、その機構解明は放射線防護や放射線治療を考え

る上で意義深い。

水晶体は、生涯成長を続けるも、がんを発症しない生体内で唯一の組織であり、水晶体には、優れたがん抑制機構が備わっていると考えられる。また、がん遺伝子、がん抑制遺伝子、DNA 損傷修復遺伝子など、様々ながん関連因子が、白内障の誘発に関与している可能性が、近年の研究から示唆されてきた¹⁹⁾。さらに、HLEC1 が、高い割合で早期細胞老化する原因は DNA 二重鎖切断 (DSB) の修復に関連するはずである。そこで、HLEC1 における DSB の誘発と修復、及び、DSB 修復阻害による放射線致死感受性の変化について、解析を進めているところである。

HLEC1 は、株化されていない初代細胞であるため細胞集団が不均一であり、株化細胞よりも水晶体上皮層の構成を反映した培養系であると考えられる。HLEC1 のコロニー形成実験は、放射線照射後の増殖促進と不活性化を培養系で評価できる実験系として有用であろう。

参考文献

- 1) Hamada, N. and Fujimichi, Y., *J Radiat Res*, **55**, 629–640 (2014)
- 2) ICRP, Publication 118 (2012)
- 3) 藤通有希, 他, 保健物理, **48**, 86–96 (2013)
- 4) 藤通有希, 他, 保健物理, **48**, 97–103 (2013)
- 5) Hamada, N., *et al.*, *J Radiat Res*, **55**, 831–846 (2014)
- 6) Hamada, N., *Radiat Res*, **181**, 9–20 (2014)
- 7) ICRP, Publication 103 (2007)
- 8) Fujimichi, Y. and Hamada, N., *PLOS ONE*, **9**, e98154 (2014)
- 9) 浜田信行, 他, 放射線生物研究, **49**, 318–331 (2014)
- 10) Hamada, N., *et al.*, *Radiat Res*, **166**, 24–30 (2006)
- 11) Hamada, N., *et al.*, *Mutat Res*, **637**, 190–196 (2008)
- 13) Sakashita, T., *et al.*, *PLOS ONE*, **8**, e70291 (2013)
- 14) Sakashita, T., *et al.*, *J Radiat Res*, **55**, 423–431 (2014)
- 15) 藤通有希, 他, 保健物理, **49**, 131–138 (2014)
- 16) Wiley, L.A., *et al.*, *Dis Model Mech*, **4**, 484–495 (2011)
- 17) von Sallmann, L., *et al.*, *Arch Ophthalmol*, **54**, 489–514 (1955)
- 18) Brown, N. and Tripathi, R., *Trans Ophthal Soc UK*, **94**, 1729–1745 (1974)
- 19) Hamada, N. and Fujimichi, Y., *Cancer Lett*, in press, doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.017 (2015)